

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461909

研究課題名(和文) 食道癌放射線耐性機序解明とHDAC阻害薬による放射線耐性克服の基礎的検討

研究課題名(英文) Valproic acid inhibits irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like characteristics in esophageal squamous cell carcinoma

研究代表者

二宮 致 (Itasu, Ninomiya)

金沢大学・大学病院・准教授

研究者番号：60345618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食道癌における放射線耐性のメカニズムを解析し、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害薬であるValproic acid (VPA)の放射線耐性克服効果を基礎的に検討した。その結果、放射線照射が食道癌細胞の上皮間葉転換(EMT)と癌幹細胞様形質を誘導し、癌細胞の放射線抵抗性や細胞浸潤能や遊走能が亢進した。VPAは放射線照射による食道癌のEMT変化と癌幹細胞様形質の獲得を阻止し放射線性浸潤・遊走能亢進を抑制するとともに、二重鎖切断修復酵素の阻害作用により放射線感受性を増大させ、放射線耐性克服効果を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of radio-resistance and the anti-radioresistant and radiosensitizing effect of classic histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid (VPA) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells. First, we showed that 2 Gy of irradiation induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem-like cell properties in ESCC TE9 cells. In addition, irradiation enhanced invasion and migration ability with upregulation of matrix metalloproteinases. Second, we found that VPA induced reversal of EMT caused by irradiation in TE9 cells, resulting in attenuated cell invasion and migration abilities. Third, VPA induced Ku70 acetylation and prolonged H2AX levels after irradiation in three ESCC cell lines (KES, TE9, TE10). Our results suggest that VPA inhibit radiation induced EMT and show radiosensitizing effect by inhibiting DNA double strand break repair pathway in ESCC.

研究分野：食道癌治療

キーワード：食道癌 放射線治療 放射線耐性 放射線感受性 バルプロ酸

1. 研究開始当初の背景

食道癌における化学放射線療法は放射線単独療法に比して有意に生存率を向上させる事が証明されている。近年の臨床試験の結果より病期の食道癌においては化学放射線療法の治療成績は手術療法と同等であり化学放射線療法は食道癌の非外科的治療法の標準治療法として位置づけられるようになった。しかし進行食道癌に対する化学放射線療法の成績は未だ不十分であり、病期の進行食道癌では、外科的治療法が第一の治療法と認識されている。進行癌においては抗がん剤や放射線治療に対する抵抗性が観察され、治療抵抗性の原因解明は至急の課題となっている。近年、抗がん剤や放射線治療抵抗性のメカニズムの一つとして癌幹細胞理論が注目されている。腫瘍を構成する癌細胞のうち腫瘍形成能を持つ癌幹細胞は周囲の微小環境との相互作用により休止状態に留まり、抗がん剤や放射線療法に治療抵抗性を示すとされている。また、進行癌の組織内では低酸素環境が形成され、転写因子 Hypoxia Inducible Factor (HIF) が誘導されることにより血管新生や癌の浸潤に関与する種々の遺伝子発現が誘導される。さらに癌細胞が放射線や抗がん剤によるストレスを受けると Heat Shock Protein(HSP)が誘導され細胞を保護する働きが生まれる。HSP は分子シャペロン機能により、高次構造の破壊されたタンパク質の修復およびタンパク質変性の抑制機能を有している。HIF1 は HSP90 のクライアントタンパクであり、HSP90 により保護修復されている。最近になり低酸素環境下で誘導される HIF1 が癌幹細胞マーカーである CD133 の転写を促進する事がわかった (Hashimoto O, et al Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor -1- dependent manner in pancreatic cancer cell. Pathology 2011)。以上より癌組織内の低酸素環境や治療による細胞ストレスが HSP90, HIF1 を介して癌細胞の幹細胞様形質転換や上皮間葉転換: Epithelial-mesenchymal transition (EMT)を促進し、抗がん剤や放射線治療への抵抗性に関与している可能性が示唆されている。一般的に HDAC 阻害薬はヒストンならびに非ヒストンの脱アセチル化阻害作用を介してアポトーシスを誘導する事が知られている。Valproic acid (VPA)は HDAC Class I a を選択的に阻害し、HSP90 を脱アセチル化させる HDAC 6 に対する抑制効果は比較的弱いものの HSP70 のアセチル化を介して間接的に HSP90 のシャペロン機能を抑制すると報告されている。そのため VPA は HSP70 をアセチル化し機能阻害することにより癌細胞の幹細胞様形質転換を阻害するのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

食道癌における放射線耐性のメカニズムを解析すると共に、HDAC 阻害薬である Valproic acid (VPA)の放射線耐性克服効果をもとに癌幹細胞形質や EMT の観点から基礎的に検討する事を目的とする。

3. 研究の方法

食道癌扁平上皮癌細胞株 (TE9, TE10, TE11, TE14 :東北大学医用細胞資源センターから供与, KES: 当科にて樹立したヌードマウス移植可能細胞株)に対する VPA の細胞増殖抑制効果ならびに殺細胞効果を MTT assay ならびに Trypan blue 染色により評価した。

またこれらの細胞に低用量の放射線照射を行い。細胞の形態変化を位相差顕微鏡で観察し、EMT関連表面マーカー発現の変化を蛍光免疫染色と Western blotにより確認した。放射線による EMT誘導のメカニズム解明目的に TGF- β / smad 経路の活性化を検討し、EMTを誘導する転写因子の変化を検討した。さらに放射線照射により誘導される癌幹細胞様形質の獲得を Western blot で行った。放射線誘導性EMTに伴って起こる癌細胞の運動能と遊走能の変化を Invasion assay 及び Migration assay を用いて行った。以上の変化をVPAが抑制しているか確認した。

放射線照射によって起こるDNA二重鎖切断 (DSB) の経時的变化を H2AX の Western blot ならびに蛍光免疫染色により確認した。VPAの二重鎖切断修復阻害作用を検討した。VPAの二重鎖切断修復酵素に対する阻害効果を確認した。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌細胞株 (TE9, TE10, TE11, TE14)を用いて VPA の抗腫瘍効果を MTT アッセイで検討した。VPA はすべての細胞株において用量依存性に増殖を抑制した。VPA の IC₅₀ は 1.02-2.15 mM であり、これは臨床的に抗てんかん薬として投与された時の安全血中濃度よりも高値であった。

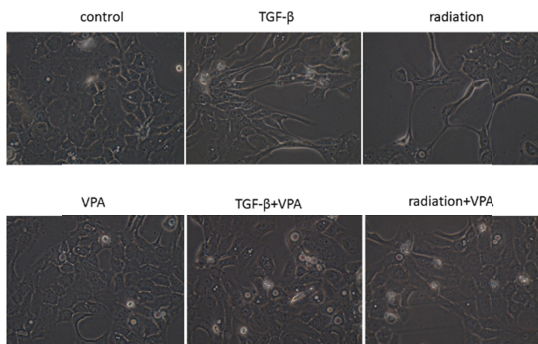
TE9細胞に対しVPA 0.1-10mMの各種濃度において、48時間 incubation し trypan blue 染色を行ったところ、10mM、48時間までの incubation においてはVPAによる殺細胞効果は認めなかった。

次に TE9 細胞を用いて TGF- β ならびに Radiation 照射による細胞形態の変化と 0.5mM VPA の影響を位相差顕微鏡により確認した。

その結果コントロール群では多角形の細胞

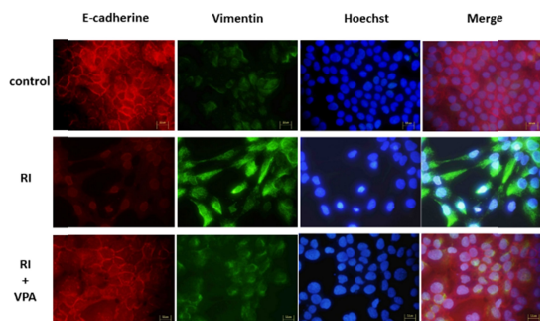
が、細胞間接着は密に存在していたが、TGF- β や radiation 照射により紡錘形の形態へと変化し、細胞間接着は粗になった。VPA 投与によりその変化が抑制されていることが確認された。

48時間後の形態変化



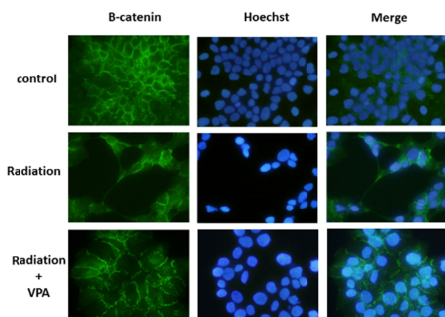
蛍光免疫染色による EMT 関連マーカー発現の検討では TE9 細胞において E カドヘリンは細胞膜の表面に存在し、また vimentin の発現はほとんどみられなかったが、TGF- β 投与や radiation 照射により E カドヘリンの細胞膜表面の発現は減弱し、また核内に移行した。逆にビメンチンの発現は増加した。これらの変化は VPA 投与により抑制された。

放射線誘導性 EMT 関連マーカー変化の観察 <刺激後48hr>



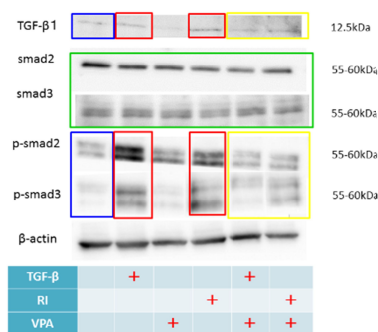
同様に カテニンの局在変化を蛍光免疫染色にて確認したところ多角形の細胞表面に発現していた カテニンは、TGF や放射線照射により、紡錘形へと形態変化し、核内へ移行したが、VPA はこの変化を抑制した。

β -カテニン局在変化の観察 <刺激後48hr>

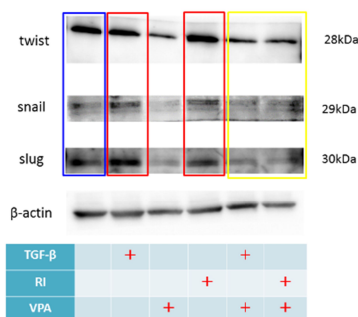


次に、これら EMT 関連マーカーやがん幹細胞形質の発現変化を Western blot にて確認した。その結果 TGF- β 刺激や放射線照射によって E カドヘリン発現減弱とビメンチンの発現増加 TGF- β 1 の発現亢進に加えて Smad2 Smad3 のリン酸化と EMT の調節因子である Twist Snail Slug の発現亢進がみられ EMT が誘導されたことが明らかとなった。さらに MMP 2, 7, 9 の発現の亢進がみられた。これらの変化は VPA により抑制された。さらにフローサイトメトリーにより、がん幹細胞形質のマーカーである CD44 の発現亢進と VPA による抑制も確認された。

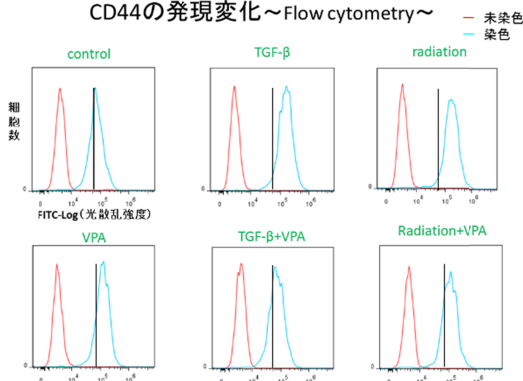
EMTシグナル伝達経路(TGF- β /smad pathway)の分子動態



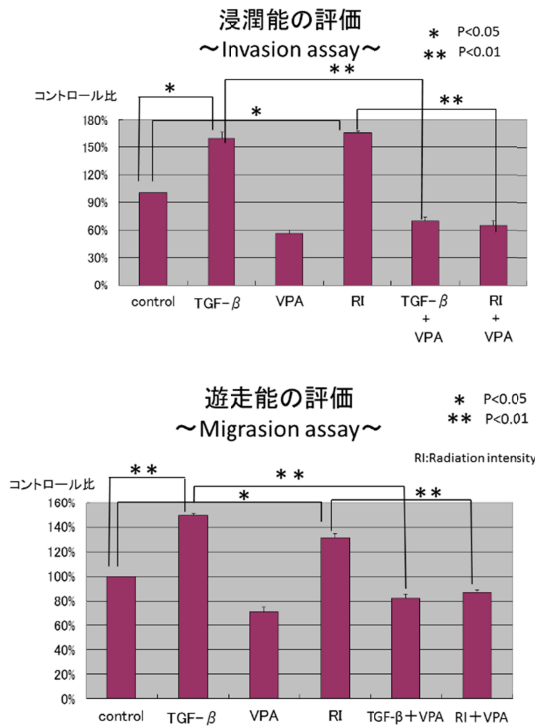
EMTマーカー転写調節因子の動態



CD44の発現変化~Flow cytometry~

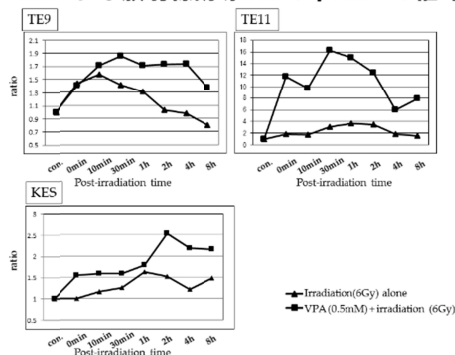


TE9 細胞において TGF- β ならびに Radiation 照射による細胞浸潤能と遊走能の変化と VPA の効果を Invasion assay ならびに Migration assay により検討した。その結果、TGF- β 投与や放射線照射により、TE9 細胞の浸潤・遊走能は亢進し、VPA は TGF- β 投与や放射線照射による浸潤・遊走能の亢進を抑制した。



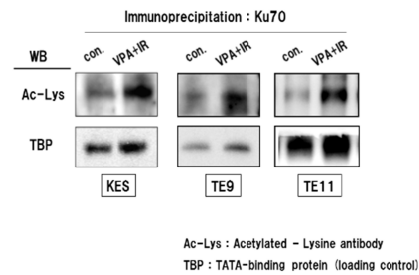
さらにTE9 TE11 KES細胞において放射線照射によっておこるDNA二重鎖切断(DSB)の経時的变化とVPAによるDSBの増強を H2AXの Western blot ならびに蛍光免疫染色により検討した。VPAは放射線照射後 DSB を増強し、経時的にもDSBが減少しないことより、VPAが放射線照射後の二重鎖切断修復を阻害している事が確認された。

VPAによる放射線誘導DSBの γ H2AXの経時的变化



次に VPA の DNA DSB 増強作用のメカニズムとして VPA の非ヒストンアセチル化作用に着目し、DNA DSB 修復酵素のうち非相同末端結合の主要酵素である Ku70 のアセチル化による機能阻害を抗 Ku70 抗体による免疫沈降と抗アセチルリジン抗体による Western blot 法により確認した。その結果 VPA は TE9 TE11 KES のすべての細胞で Ku70 をアセチル化し機能阻害することにより DNA DSB 修復を阻害したことが明らかとなった。

VPAによるKu70のアセチル化の検討



本研究により 放射線は食道癌細胞に EMT 及びがん幹細胞様形質を誘導し、MMP の亢進を介して浸潤・増殖能を亢進させることが明らかとなり、致死に至らない放射線治療が食道癌の浸潤転移をかえって増強している可能性を示唆した。しかし VPA はこれら EMT やがん幹細胞形質への転換を阻止し、放射線治療に伴うがん転移を予防しうる可能性を示した。

さらに放射線治療により誘導される DNA 二重鎖切断(DSB)は速やかに修復酵素により修復されるが VPA は非相同末端結合の主要タンパクである Ku70 をアセチル化することにより機能阻害し DNA DSB 修復阻害による治療効果促進機能を有することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- Ayako Kanamoto, Itasu Ninomiya
Valproic acid inhibits irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and stemcell-like characteristics in esophageal squamous cell carcinoma. (Int J Oncol 投稿中) (査読あり)
- Naoki Makita, Itasu Ninomiya
Inhibitory effects of valproic acid in DNA double-strand break repair after

irradiation in esophageal squamous carcinoma cells. Oncol Rep 34 (3) 1185-1192, 2015 (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

牧田直樹、二宮 致 食道癌細胞における Valproic acid の放射線照射後 DNA 二重鎖切断修復阻害効果 第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016.4.14(リーガロイヤルホテル大阪・大阪府大阪市)

金本斐子、二宮 致 食道癌細胞における valproic acid Epithelial to Mesenchymal Transition(EMT)と cancer stem like cell feature 抑制効果の検討 第 12 回日本消化器外科学会大会 2014.10.26 (神戸国際会議場・兵庫県神戸市)

金本斐子、二宮 致 食道癌細胞における valproic acid の上皮間葉転換抑制効果の検討 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会 2014.7.11 (金沢ニューグランドホテル・石川県金沢市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

二宮 致 (NINOMIYA ITASU)
金沢大学・大学病院・准教授
研究者番号:60345618